

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462682

研究課題名(和文) まったく新しい舌痛症治療のための基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental research for novel treatment of glossodynia

研究代表者

石田 雄介 (Ishida, Yusuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30381809

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は原因が不明であり、現在もよい治療がない舌痛症に対して新しい治療法を確立するための基礎的研究である。

興味のあることに1つのメカノセンサー候補遺伝子は、三叉神経節の下顎神経領域に特に多く発現することが示唆された。この遺伝子は舌痛症に重要な役割を果たすがためにこのように下顎神経領域に特異的に発現しているのかもしれない。この下顎神経領域に特異的に発現するメカノセンサー候補遺伝子が舌痛症に関与しているのならば、これまでに知られている痛覚に関する遺伝子と何らかの関係があるのではないかという仮説のもと実験を進め、一定の結果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The cause of glossodynia is unclear and there is no good treatment for the sickness at present.

We performed fundamental research to establish novel treatment of glossodynia. Interestingly, it was indicated that one candidate gene of mechanosensor is especially expressed in the mandibular nerve area of trigeminal ganglion. This gene is perhaps expressed in the area because of that plays an important role in glossodynia. We progressed our research under hypothesis that there is some kind of relation between the mechanosensor and the gene related in pain, if the sensor is mediated in glossodynia, and had some good results.

研究分野：味覚、耳鼻咽喉科学、感覚器

キーワード：舌痛症

### 1. 研究開始当初の背景

舌痛症は耳鼻咽喉科と歯科にとっても多い疾患であるが、原因が不明であり、現在もよい治療法がないのが現状である。

これまでの舌痛症の治療は、抗うつ薬を服用するなどして、しばしば数ヶ月の期間を必要としており、新しい治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、疾患数が多いことに加えて、治療に難渋することが多い舌痛症に対してまったく新しい治療法を確立するために基礎的研究を行うことである。

### 3. 研究の方法

平成25年度は以下の(1)~(9)に示すようにおもに三叉神経(舌尖を支配する下顎神経領域)におけるメカノセンサー候補遺伝子の発現の確認を行った。

(1) AGPC法を用いた三叉神経節 Total RNA の採取 (2) Reverse transcriptase reaction (逆転写酵素反応) (3) Polymerase chain reaction (PCR 反応) (4) PCR 産物の DNA 用 1% アガロースゲルでの電気泳動

(5) マウス三叉神経節に発現するメカノセンサー候補遺伝子の判定 (6) PCR 産物の pGEM T Easy vector への組み込み (7) transformation (形質転換) の後 液体培地を用いた培養 (8) DNA sequencing によるクローンの配列の確認 (9) *in vitro* transcription 法による complementary RNA プロブの作成、順に説明する。

(1) AGPC法を用いた三叉神経節 Total RNA の採取

ワイルドタイプマウスを過剰量のペントバルビタール(200 mg/kg、腹腔注射)を投与により sacrifice して三叉神経節を採取し、Isogen® を加えてホモジナイズをした。

遠心分離して、上清を別のチューブに移してクロロホルムを用いて精製した後、イソプロパノール沈殿を行った。収量を確認するために沈殿を蒸留水に溶かした後に吸光度測定を行った。

同時にこの total RNA のうち数  $\mu\text{g}$  を RNA 泳動用の変性ゲルにアプライし、電気泳動をおこなって、その泳動パターンから採取した total RNA の質を評価した。すなわち採取した total RNA が以降の実験に用いることが出来るだけの質を有しているか否かをこうして判定した。

(2) Reverse transcriptase reaction (逆転写酵素反応)

次にこのマウス三叉神経節 total RNA を template (鋳型) にして reverse transcription (RT) を行い、この先の Polymerase chain reaction (PCR) に用いることが出来るように complementary DNA (cDNA) を作成した。RT の方法は基本的にス

タンダードなものであるが多少 modify しているがここでは割愛させていただきたい。

(3) Polymerase chain reaction (PCR 反応)

並行して、これまで報告されているいくつかのメカノセンサー候補遺伝子の配列を参考にして PCR に用いるためのプライマーをデザインした。

このメカノセンサー候補遺伝子に特異的なプライマーを用いて、先のマウス三叉神経節 cDNA を template にして PCR を行った。

(4) PCR 産物の DNA 用 1% アガロースゲルでの電気泳動

PCR 反応液のうち数  $\mu\text{l}$  を取り、アガロースゲル電気泳動を行った。

DNA マーカーを頼りにマウス三叉神経節におけるメカノセンサー候補遺伝子の発現を確認した。

(5) マウス三叉神経節に発現するメカノセンサー候補遺伝子の判定

条件を変えながら、以上の実験を繰り返し、慎重に判定を行うようにした。

その結果、マウス三叉神経節に発現するメカノセンサー候補遺伝子をいくつか絞り込むことが出来た。

(6) PCR 産物の pGEM T Easy vector への組み込み

メカノセンサー候補遺伝子と予想される PCR 産物をゲル切り出しして精製した。

そして DNA ligase を用いて T Easy vector® に ligation を行った。

(7) transformation (形質転換) の後 液体培地を用いた培養

次に ligation 液をコンピタントセルに transformation (形質転換) を行い、Ampicilin を含むプレート培地で培養し、ブルーホワイトセレクションでコロニーを選択した上で、2xYT 培地を用いて培養を行った。

(8) DNA sequencing によるクローンの配列の確認

培養液を遠心分離して、上清を可及的に除去した後に Mini-prep 法を用いてクローンを回収した。

吸光度測定を行い濃度および収量を確認し、次にサンガー法を用いてシーケンスの確認を行い、マウスのメカノセンサー候補遺伝子であることを confirm した。

(9) *in vitro* transcription 法による complementary RNA プロブの作成

次に *in situ* hybridization 法(原位置ハイブリダイゼーション法)を用いて、三叉神経節において細胞レベルでのメカノセンサー候補遺伝子の発現を確認するための cRNA プロブの作成を行った。

すなわち、適当な制限酵素を用いてクローンを linearize し、T7 または SP6 RNA polymerase を用いて *in vitro* transcription 法を実施してメカノセンサー候補遺伝子に対する cRNA プロブ(セン

スプローブおよびアンチセンスプローブ)を作成した。

以上は平成26年度も引き続き行われた。

平成26年度は引き続いて主にワイルドタイプマウスを対象に三叉神経におけるメカノセンサー候補遺伝子の発現に関して検討した。平成25年度から作成していたcRNAプローブをいくつか用いて *in situ* hybridization 法でマウスの三叉神経節におけるこれらのメカノセンサーの候補遺伝子の mRNA の発現を検討した。

三叉神経節には、その名の通り、3つの領域があり、眼神経、上顎神経、下顎神経の領域であるが、舌痛症に関連するのはその解剖学的見地から下顎神経領域と考えられる。すなわち下顎神経領域に特に多く発現するメカノセンサーの候補遺伝子が舌痛症と関連している可能性が高い。

順に説明する。

*In situ* hybridization

#### (1) 切片の作製

マウスは過剰量のペントバルビタール (200 mg/kg) を腹腔注射して sacrifice した。

顕微鏡下に小さなピンセットとハサミを用いてマウスの三叉神経節を丁寧にかつ素早く採取した。

採取した三叉神経節は、緩衝液 Phosphate buffer / saline (PBS) で洗った後に、O.C.T. compound に包埋された。

次に三叉神経節の新鮮切片をクリオスタットを用いて作製した。厚さは 10 μm 前後とした。これは何度か *in situ* hybridization を行い、その経験から決定した。接着性の良さを考慮し、Matsunami の MAS コートスライドを使用した。

#### (2) Pre-hybridization 処理

切片を貼付けたスライドはドライヤーで風乾の後、ホルマリン水溶液を用いて固定された。

無水酢酸と TEA (トリエタノールアミン) を蒸留水に希釈した溶液を用いて 10 分間アセチレーションを行った。

#### (3) ハイブリダイゼーション

その後、cRNA プローブを含んだハイブリダイゼーションバッファーを標本にアプラインしてオーバーナイトで反応させた。

ハイブリダイゼーションは何度も行い、最適なハイブリ温度は経験的に決定をした。

プレハイブリダイゼーション処理も経験的に行うか否か決定したが、この場合なくてもあまり変わらないように感じられたのでプレハイブリダイゼーション処理は行わないこととした。

#### (4) ハイブリ後 洗浄、RNase A 処理

ハイブリ後の洗浄および RNase A 処理は比較的しっかりと行うほうがよいと思われた。これも何度か行うことで経験的に決定した。

#### (5) ブロッキングおよび抗体反応

ブロッキングはメーカー (Roche) から販売されているものを用いた。抗体は、現在標準的に用いられていると思われるプローブの DIG 標識に対する anti-DIG-AP 抗体 (Roche) を用いた。

#### (6) BCIP/NBT による発色

Development は BCIP/NBT を用いてオーバーナイトで行った。

#### (6) 観察

オリンパスの光学顕微鏡を用いて行った。

その結果、あるメカノセンサー候補遺伝子が特に下顎神経領域に発現していることが判明した。

平成27年度はこの下顎神経領域に特異的に発現するメカノセンサー候補遺伝子が舌痛症に関与しているのならば、これまでに知られている痛覚に関与する遺伝子と何らかの関係があるのではないかという仮説のもと実験を進めた。

## 4. 研究成果

三叉神経節は、主に第1枝(眼神経)、第2枝(上顎神経)、第3枝(下顎神経)からなるが、舌痛症に関与するのは解剖学的見地から下顎神経が主であると考えられる。

興味のあることに1つのメカノセンサー候補遺伝子は、三叉神経節の下顎神経領域に特に多く発現することが示唆された。この遺伝子は舌痛症に重要な役割を果たすがためにこのように下顎神経領域に特異的に発現している可能性がある。すなわちこのメカノセンサー候補遺伝子が舌痛症に関わっているという仮説は、たいへん理にかなっていると考えられた。

そしてこの下顎神経領域に特異的に発現するメカノセンサー候補遺伝子が舌痛症に関与しているのならば、これまでに知られている痛覚に関与する遺伝子と何らかの関係があるのではないかという推測のもと実験を進めた。そして一定の結果を得ることができたので論文として世界に発信できるようにデータをまとめている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 雄介 (ISHIDA, Yusuke)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号： 30381809

### (2) 研究分担者

島田 昌一 (SHIMADA, Shoichi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号： 20216063

中村 雪子 (NAKAMURA, Yukiko)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号： 90548083

近藤 誠 (KONDO, Makoto)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号： 50633012